



TITLE:

Biochemical and applied studies on
unsaturated fatty acid metabolisms in lactic
acid bacteria(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takeuchi, Michiki

CITATION:

Takeuchi, Michiki. Biochemical and applied studies on unsaturated fatty acid
metabolisms in lactic acid bacteria. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19046>

RIGHT:

許諾条件により本文は2016/03/23に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	竹内道樹
論文題目	Biochemical and applied studies on unsaturated fatty acid metabolisms in lactic acid bacteria (乳酸菌の不飽和脂肪酸代謝に関する生化学的研究とその応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、腸内細菌叢がヒトの健康に大きく影響を与えていることが明らかとなり、その生理機能に注目が集まっている。腸内細菌のうち、乳酸菌は、血圧降下作用、コレステロール低下作用、整腸作用、抗腫瘍作用など、多くの有益な生理機能を有しており、乳酸菌の代謝産物がヒトの健康に影響を与えていると考えられている。また、食の欧米化に伴うメタボリックシンドロームや脂質代謝異常症といった生活習慣病が問題となっている。その原因である高脂肪食由来の脂質は、腸内において乳酸菌をはじめとした腸内細菌によって代謝されていると考えられているが、その詳細は不明である。リノール酸を共役リノール酸へと効率的に変換する乳酸菌<i>Lactobacillus plantarum</i> AKU 1009aの脂肪酸代謝経路の解析により、本代謝系に関わる酵素としてCLA-HY（水和脱水酵素）、CLA-DH（酸化還元酵素）、CLA-DC（異性化酵素）、CLA-ER（エノン還元酵素）が見いだされるとともに、リノール酸がオレイン酸へと飽和化される新たな代謝系が見いだされている。また、腸内細菌を有するSpecific pathogen-free (SPF) mouseと腸内細菌をもたないGerm-free (GF) mouseの比較において、本代謝経路の初期代謝産物である水酸化脂肪酸が、SPF mouseの組織に優位に存在していることも明らかにされている。さらには、本代謝経路中間体として見いだされた水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸において、腸管保護作用や脂質代謝異常症改善作用など、新規な機能性脂質として期待される生理活性が見いだされている。</p> <p>本研究では、乳酸菌<i>L. plantarum</i>による新規な不飽和脂肪酸飽和化代謝に関し、代謝経路の詳細や関与する酵素の諸性質を解明するとともに、有用脂肪酸生産への応用を試みた。</p> <p>第一章では、水酸化脂肪酸の誘導に関わる酵素、CLA-HY（リノール酸水和酵素）の諸性質を解明した。本酵素は、リノール酸の水和反応と 10-hydroxy-<i>cis</i>-12-octadecenoic acid（HYA）の脱水反応を触媒する水和脱水酵素であり、本酵素が産生するHYAは、腸管バリア保護作用を有する機能性脂質である。本酵素の基質特異性について検討した結果、$\Delta 9$位に<i>cis</i>型二重結合を有する炭素数18の遊離型脂肪酸を水和し 10-ヒドロキシ脂肪酸へと変換する反応を可逆的に触媒することを明らかにした。さらに、本酵素の水和、脱水活性について検討したところ、FADを補酵素とし、NADHの添加により活性が上昇することを見いだした。本酵素により生産されたHYA、10-hydroxy-<i>cis</i>-12,<i>cis</i>-15-octadecadienoic acid、10-hydroxy-<i>cis</i>-6,<i>cis</i>-12-octadecadienoic acidの水酸基の立体構造を解析したところ、いずれも<i>S</i>体（99% <i>e.e.</i>以上）であり、水和反応における立体選択性が高いことを明らかにした。</p> <p>第二章では、オキソ脂肪酸の誘導に関わる酵素、CLA-DH（水酸化脂肪酸脱水素酵素）の諸性質を解明した。本酵素は、HYAの10-oxo-<i>cis</i>-12-octadecenoic acidへの変換を</p>			

可逆的に触媒する脱水素酵素であり、本酵素が誘導する10-oxo-cis-12-octadecenoic acidは、脂質代謝異常症改善作用を有する機能性脂質である。本酵素の酸化、還元反応における補酵素はそれぞれNAD⁺、NADHであり、本酵素の還元活性は、酸化活性の約5倍であった。また、本酵素が、10位に水酸基を有する脂肪酸だけでなく、12位や13位に水酸基を有する脂肪酸にも作用する基質特異性の広い脱水素酵素であることを明らかにした。また、還元反応により生成するHYAがS体R体の混合物であり、本酵素の還元反応における立体選択性が低いことを明らかにした。

第三章では、13-hydroxy-cis-9-octadecenoic acidを生産する*Pediococcus* sp. AKU 1080のリノール酸代謝の解明を行った。本菌は、リノール酸をHYA、13-hydroxy-cis-9-octadecenoic acidへ変換し、さらにこれらの水酸化脂肪酸を10,13-dihydroxyoctadecanoic acidへと変換することを明らかにした。このうち、HYA、13-hydroxy-cis-9-octadecenoic acidは、SPF mouseの小腸に優位に存在することから、本菌で見いだされた代謝が腸管内で機能していることが予想された。これまで13-ヒドロキシ脂肪酸の有効な供給法はなく、その機能性は不明であったが、本菌を用いた13-ヒドロキシ脂肪酸の生産により供給が可能となり、13-ヒドロキシ脂肪酸の生理機能の解析が可能となった。

第四章では、リノール酸水和酵素CLA-HYを用いた水酸化脂肪酸生産を試みた。HYAは、腸管バリア保護作用を有する機能性脂質であるが、効率的な供給法は確立されていない。CLA-HYを高発現する形質転換大腸菌を触媒として用い、1 Mのリノール酸を変換率80%でHYAへと変換することに成功した。さらに、低温における生成物の溶解性の低さを利用し、反応平衡を生成物側へ移動させることで、収率を98%まで向上することに成功した。さらに、 $\Delta 9$ 位にcis型二重結合を有する α -リノレン酸、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、リシノール酸についても、変換率95%以上で対応する10-ヒドロキシ脂肪酸へと変換することに成功した。また、本反応はNADHにより活性化されるが、グルコースを反応液に添加することで、大腸菌内在の解糖系によりNADHを供給することが可能となり、NADH非添加条件にて、1 Mのリノール酸を収率96%でHYAへと変換することに成功した。

第五章では、第四章で生産可能となった水酸化脂肪酸や、その酸化で得られるオキソ脂肪酸のバイオポリマー原料としての応用を検討した。ラッカーゼが触媒する酸化的開裂反応により、リノール酸や γ -リノレン酸が炭素数9や炭素数6のジカルボン酸へと変換されることが知られているが、C10のジカルボン酸生産に適した基質は存在しない。そこで、種々の10-ヒドロキシ脂肪酸や10-オキソ脂肪酸を基質として用い、ラッカーゼの触媒する酸化的開裂反応に供したところ、炭素数10のジカルボン酸の生成を確認した。このように、乳酸菌の生産する水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸が、バイオポリマー原料として有用な化合物であることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腸内細菌による食事成分の代謝が注目されており、メタボリックシンドローム等の生活習慣病の原因である高脂肪食由来の脂質代謝の解明が求められていた。本論文は、腸内細菌の一つである乳酸菌の脂質代謝を明らかにしたものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. リノール酸飽和化代謝の初発反応を触媒するリノール酸水和酵素CLA-HYが、FADを補酵素とし、NADHで活性化される新規な酵素であることを明らかにした。また、本酵素が、 $\Delta 9$ 位にcis型二重結合を有する炭素数18の遊離型脂肪酸を10-ヒドロキシ脂肪酸へと変換する水和反応を可逆的に触媒することを明らかにした。
2. リノール酸飽和化代謝に関わる水酸化脂肪酸脱水素酵素CLA-DHが、10位に水酸基を有する脂肪酸だけでなく、12位や13位に水酸基を有する脂肪酸にも作用することを示し、short chain dehydrogenase/reductase superfamilyに属するタンパク質としては、これまでにない基質特異性を示す新規な脱水素酵素であることを明らかにした。
3. *Pediococcus* sp. AKU 1080におけるリノール酸代謝を解明し、SPF mouseとGF mouseの比較において存在量に有意な差が見られた13-hydroxy-cis-9-octadecenoic acidの生成機構を明らかにした。また、本菌を用いることにより、13位に水酸基を有する水酸化脂肪酸の生産を可能とした。
4. リノール酸水和酵素CLA-HYを用いることにより、機能性脂質として期待される様々な10-ヒドロキシ脂肪酸の生産法を確立した。また、本酵素の活性化に必要なNADHをグルコースで代用するプロセスを開発した。
5. ラッカーゼの触媒する酸化的開裂反応を活用し、炭素数10のジカルボン酸を生産する酵素プロセスを構築した。また、乳酸菌の生産する水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸が、バイオポリマー原料となる炭素数10のジカルボン酸の生産に有用な化合物であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、腸内細菌の一つである乳酸菌における不飽和脂肪酸の飽和化代謝を初めて詳細に解明するとともに、その代謝中間体である水酸化脂肪酸の実用的な生産法を提示し、機能性脂質ならびに化成品への応用を可能とするものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年2月5日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）